

환취 담즙울체간의 Plasma Membrane, Mitochondria 및 Microsome 의 5'-Nucleotidase 와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase 의 활성치*

계명대학교 의과대학 생화학교실

곽춘식 · 김여희 · 문교철

= Abstract =

5'-Nucleotidase and Gamma-Glutamyl Transpeptidase Activities in the Cholestatic Rat Liver Plasma Membranes, Mitochondria and Microsomes

Chun Sik Kwak, PhD; You Hee Kim, MD; Kyo Cheol Mun, MD

*Department of Biochemistry, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

Changes in the activities of the following have been studied over a period of forty two days following the ligation of common bile duct in rats: plasma membrane, microsomal, mitochondrial, nuclear and cytosolic 5'-nucleotidase and gamma-glutamyl transpeptidase of cholestatic liver. The activities of alkaline phosphatase in the subcellular fractions of cholestatic liver were also measured.

The activities of microsomal and cytosolic 5'-nucleotidase in cholestatic liver markedly elevated between the second and the forty-second days of the operation. However, the plasma membrane, mitochondrial and nuclear 5'-nucleotidase activities in the cholestatic liver showed a substantial decrease from three days to forty two days after the ligation of common bile duct.

The activities of hepatic microsomal, cytosolic, plasma membrane, mitochondrial and nuclear gamma-glutamyl transpeptidase drastically increased throughout the experiments.

The activities of microsomal and cytosolic alkaline phosphatase in the cholestatic liver strikingly increased during the forty two days following the operation, but the plasma-membrane bound alkaline phosphatase in the cholestatic liver had a significant diminution after the ligation of common bile duct.

서 론

5'-Nucleotidase(5'-ribonucleotide phosphohydrolyase, EC 3.1.3.5, 5'-NT)는 5'-ribonucleotide 들을 가수분해하여 인산염 유리지키는 효소(Wilkinson, 1976a)로서 진핵세포의 plasma membrane, microsome 및 mitochondria 등의 막의 외측표면

에 편재되어 있으며 nuclei 및 cytosol 분획에서도 발견된다고 한다(Song 과 Bodansky, 1967; Widnell, 1972; Evans와 Gurd, 1973; Riemer 및 Widnell, 1975; Maito 및 Tsushima, 1976; Greger와 Fabianowska-Majewska, 1980). 이 효소는 동물의 거의 모든 조직에 분포되어 있으며(Newman 등, 1950; Reis, 1951; McManus 등, 1952; Novikoff와 Essner, 1952; Naidoo, 1962)

* 이 논문은 1986년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

혈장과 담즙에도 출현한다(Hill과 Sammons, 1967; Bergmeyer, 1974)고 한다.

γ -Glutamyl transpeptidase(γ -glutamyl) peptide: amino acid 5-glutamyl transferase, EC 2.3.2.2, γ -GTP)는 γ -glutamyl기가 결합된 peptide로부터 γ -glutamylamide를 유리시켜 다른 peptide로 전이시키는 반응을 촉매하는 효소(Goldberg 등, 1960; Szczeklik 등, 1961; Rosaki와 Rau, 1972)이며, plasma membrane, microsome 등의 막의 외측표면에 편재되어 있으며, cytosol막 하에서도 발견되는 것(Szewczuk, 1972; Hurghey와 Curthoys, 1976; Horiuchi 등, 1977)으로 알려져 있다. 그리고 이 효소도 역시 동물조직에 분포되어 있으며 혈장, 요, 담즙 및 뇌척수액 등에도 나타나는 것(Albert 등, 1961; Orlowski와 Szewczuk, 1961; Kokot 등, 1965; Naftalin 등, 1969)으로 알려져 있다.

이들 효소는 간에서 그 함성이 왕성하며 특히 담도세포에 그 함유량이 많다고 하며 alkaline phosphatase(ortho-phosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1, ALP)와 leucine aminopeptidase(α -aminoacyl peptide hydrolase(cytosol), EC 3.4.11.1, LAP)와 더불어 담도계 효소라 부르고 있다(Rutenburg 등, 1969; Song 등, 1969; Kaplan, 1972; 鈴木, 1976; Wilkinson, 1976b).

5'-NT와 γ -GTP는 담즙울체가 수반되는 간담도 질환에서 혈중에 현저히 증가됨이(Young, 1958; Szczeklik 등, 1961; Bardawill과 Chang, 1963; Gibinski 등, 1963; Rutenburg 등, 1963; Aronsen 등, 1965; Villa 등, 1966; Eshehar 등, 1967; Hill과 Sammons, 1967; Belfield와 Goldberg, 1969; Aronsen 등, 1970; Connell과 Dinwoodie, 1970; Belfield, 1972; Lum과 Gambino, 1972; Whitfield 등, 1972; Brocklehurst 등, 1976; Ellis 등, 1978) 알려져 있다. 그러나 그 증가기전은 아직도 분명치 않으며 역류정체설(Rutenburg 등, 1963; Holdsworth와 Coleman, 1975; Evans 등, 1976; Mullock 등, 1977), 합성증가설(Albert 등, 1961; Kryszewski 등, 1973) 및 유리설(Reghetti와 Kaplan, 1972; Voyvoda 등, 1977) 등 세 가지 상반된 학설이 주장되고 있다.

이 연구는 담즙울체가 수반되는 간담도질환에서 혈중에 증가되는 혈청 5'-NT 및 γ -GTP의 증가기전과 담즙울체의 시간 연장이 간의 plasma mem-

brane, microsome, mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획층의 이들 효소의 활성도에 어떤 변동을 초래시키는지 알아 보기 위한 것으로서 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 각 시기에 적출한 담즙울체 간을 세포분획하여 각 세포분획에서 이들 효소의 활성과 ALP 활성도를 측정하여 그 성적을 상호 비교 검토한 것이다.

재료 및 방법

동물 및 처치: 동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 320~350g이 되는 Sprague-Dawley 종의 숫흰쥐를 사용하였으며 정상군, 가수술 및 총담관결찰군으로 나누어서 가수술 또는 총담관결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 쥐를 각각 5마리씩 죽여 실험에 사용하였다.

담관결찰 후 14일까지는 죽는 예가 없었으나 그 이후부터는 약 50%가 죽었다. 그러므로 28일 및 42일군은 총담관 결찰 후 28일 및 42일까지 생존한 흰쥐 5마리씩을 사용하였다.

각 실험군들은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 제일사료주식회사의 제품을 사용하였으며 물과 함께 자유로이 먹도록 하였다.

총담관결찰수술은 효소활성의 일변동들을 고려하여 쥐를 일정한 시간에 죽일 수 있도록 수술시간을 조절하였으며 12시간 절식시킨 후 가능한 한 무관상태를 유지하면서 약한 ether 마취 하에서 실시하였다.

총담관의 결찰은 가급적 간에서 근접한 부위의 총담관과 바로 아래쪽 약 1cm 되는 지점의 총담관을 선택하여 각각 결찰한 후 위 및 아래쪽 결찰된 담관의 중간 지점을 절단해 두었다. 담관의 결찰은 이 중으로 하였으며 채혈 및 잔 적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 가수술은 총담관결찰만 하지 않고 그의 조작은 담관결찰군과 동일하게 하였다.

시약: Sodium deoxycholic acid, 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate), L- γ -glutamyl-p-nitroanilide, glycylglycine, p-nitroaniline, disodium phenyl phosphate, 4-aminoantipyrine, phenol, 종합표준효소(enzyme control 2-N), 5'-nucleotidase(5'-ND, control-N) 및 단백표준액(10g/100ml, bovine albumin) 등은 Sigma 사의 제품을 사용하였으며 그의 일반시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

간적출 및 세포분획 : 모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 절식시킨 후 약한 ether 마취하에서 시행하였으며 쥐의 복부대동맥으로부터 채혈하여 실험사시시키고 이어 간문맥으로 catheter를 넣어 4°C 의 0.25M sucrose액으로 관류하여 간에 남아 있는 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 번포로 균등히 압박하여 간에 남아 있는 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다.

적출한 간은 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 7.5g을 취하여 9배량의 0.25M sucrose액을 넣어 teflon glass homogenizer(Thomas사 제품, chamber clearance 0.005~0.007 inch)로 2~4°C를 유지하면서 400rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 다쇄하여 10w/v% 간관절액을 만들었다. 그리고는 이 간관절액 일정량을 취하여 sucrose density gradient 초원심분리법(곽 과 박, 1986)으로 microsome, mitochondria 및 cytosol 분획을 분리하였으며 Dorling 및 Le Page(1973)의 법에 따라 plasma membrane 분획을, 그리고 Conover 및 Siebert(1965)의 법에 준하여 nuclei 분획을 각각 분리하였다. 위의 세포분획법에서 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며 이때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 그리고 sucrose density gradient 용액의 제조는 gradient former(ISCO model 570)를 사용하여 제조하였다.

효소액의 조제 : 분리한 microsome, mitochondria, nuclei 및 plasma membrane은 단백질량으로 5mg/ml가 되도록 0.25M sucrose액으로 현탁시켰으며 이 현탁액을 1w/v% sodium deoxycholic acid가 포함된 1w/v% sodium bicarbonate액으로 배로 희석하여 ultrasonic dismembrator(Fisher model 300)로 20±0.4K cycles/sec의 조건으로 2분씩 5회 10분간 초음파마쇄(곽 및 장, 1985)를 하여 이것을 cytosol 분획과 더불어 5'-NT, γ -GTP 및 ALP의 효소액으로 사용하였다.

효소활성도 측정 : 간의 각 세포분획의 5'-NT 활성도의 측정은 5'-AMP를 기질로 사용하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 인산을 정량하는 Campbell(1962)의 법에 의하였다. 이 효소활성의 단위는 1분간에 1mg의 단백질이 반응하여 생성한 인산을 *n mole*로 나타내었다.

간의 각 세포분획의 γ -GTP 활성도의 측정은

L- γ -glutamyl-p-nitroanilide를 기질로 사용하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 p-nitroaniline을 정량하는 Orłowski 및 Meister(1963)법에 의하였으며 이 효소의 활성단위는 1분간에 1mg의 단백질이 반응하여 생성한 p-nitroaniline을 *n mole*로 나타내었다.

그리고 간의 각 세포분획의 ALP활성도 측정은 disodium phenylphosphate를 기질로 사용하여 효소액과 함께 37°C에서 15분간 반응시키는 동안에 생성된 phenol을 ferricyanide 존재하에서 4-aminoantipyrine과 축합하여 생성된 quinone 화합물의 적색을 비색하여 정량하는 Kind 및 King(1954)의 법에 의하였으며 이 효소의 활성단위는 1분간에 1mg의 단백질이 생성한 phenol을 *p mole*로 표시하였다.

이 실험에서 채택한 효소활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 표준효소들을 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 그리고 이 실험에서 각 효소활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer(Varian Cary 210)였다.

단백정량 : 효소액 중의 단백질량은 0.5N-perchloric acid와 methanol-ether 혼합액(3:1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg와 Rothstein(1957)법으로 효소액 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법(Gornall 등, 1949)으로 정량하였다.

얻어진 각종 성적들의 평균치 중 상호 비교가 필요한 경우는 Student의 t-검정법(Scheffler, 1980)에 의하여 검정하였다.

성 질

담즙울체간 세포분획 중의 5'-NT 활성도의 변동 : 흰쥐 담즙울체간의 microsome, plasma membrane, mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획의 5'-NT 활성도의 변동은 도 1과 같다. 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간의 microsome과 cytosol 분획의 5'-NT 활성도는 담즙울체의 시간이 경과되면서 증가되었으나 plasma membrane, mitochondria 및 nuclei 분획의 5'-NT 활성도는 감소하는 경향을 나타내었다. 즉 담즙울체간의 microsome 분획의 5'-NT 활성도는 총담관결찰 후 3일 및 7일에는 가수술군에 비해 약 48%(P<0.01)의 증가를 보였으며 42일째에도 약 15%(P<0.05)의

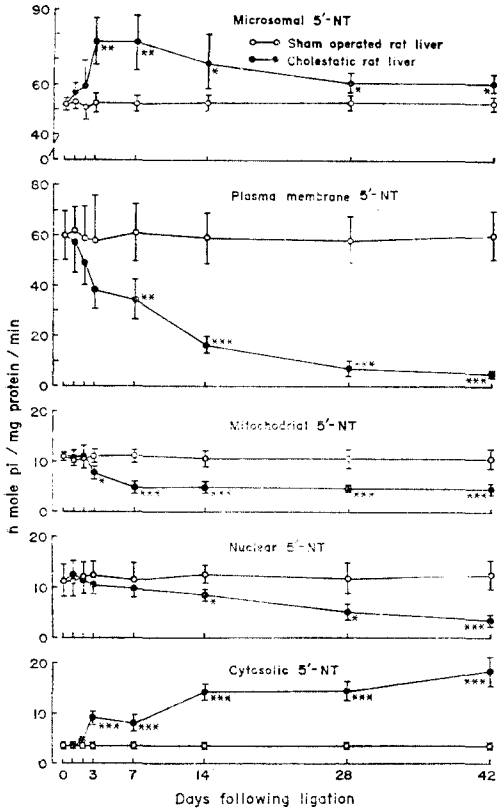


Fig. 1. 5'-Nucleotidase(5'-NT) activity of liver after bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicated mean±SD with 5 rats in each group. *; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001

증가를 보였다. Cytosol 분획의 5'-NT 활성도는 총담관결찰 후 3일에 가수분해에 비해 약 160% (P<0.001), 7일에는 약 137%(P<0.001) 그리고 이후 계속 증가되어 42일째에는 약 435%(P<0.001)의 활성 증가를 나타내었다.

Plasma membrane 분획의 5'-NT 활성도는 총담관결찰 후 1일째부터 감소되었으며 7일째에는 유의적인 감소를 나타내었다. 즉 7일째 담즙울체간은 가수분해에 비해 약 44%(P<0.01)의 감소를 보였고 그후 더욱 감소되어 42일째에는 약 91%(p<0.001) 감소되었으나 mitochondria 분획의 5'-NT 활성도는 총담관결찰 후 3일째에 가수분해에 비해 약 26% (P<0.05), 7일째에는 약 56%(P<0.001), 42일째에는 약 57%(P<0.001)의 활성 감소를 보였다. Nuclei 분획의 5'-NT 활성도는 총담관결찰 후 14일째의 담즙울체간에서 가수분해에 비해 약 33%(P<0.05)의 감소를 보였으며 이후 42일째에는 더욱

감소되어 약 73%(P<0.001)의 감소를 보였다.

담즙울체간 세포분획 중의 γ -GTP 활성도의 변동

총담관결찰 후 담즙울체간의 microsomes, plasma membrane, mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획의 γ -GTP 활성도의 변동은 도 2a 및 2b와 같다.

원래의 총담관을 절제한 후의 담즙울체간의 γ -GTP 활성도의 변동은 담즙울체간의 모든 세포분획에서 담즙울체간의 시간이 경과됨에 따라 현저히 그 활성이 증가되었다. 즉 담즙울체간의 microsomes 분획의 γ -GTP 활성도는 총담관결찰 후 2일에 가수분해에 비해 약 270%(P<0.001)의 증가를 보였으며 그후 계속 증가되어 42일째에는 약 1488%(P<0.001)의 활성 증가를 나타내었다. 담즙울체간의 plasma membrane 분획의 γ -GTP 활성도는 총담관결찰 후 14일에 가수분해에 비해 약 245%(P<0.01)의 증가를 보였으며 그후 계속 증가되어 42일째에는 약 1520%(P<0.001)의 활성 증가를 보였다. 담즙울체간의 mitochondria 분획의 γ -GTP 활성도도 plasma membrane 분획에서와 같이 총담관결찰 후 14일부터 현저히 증가되었으며 42일째에는

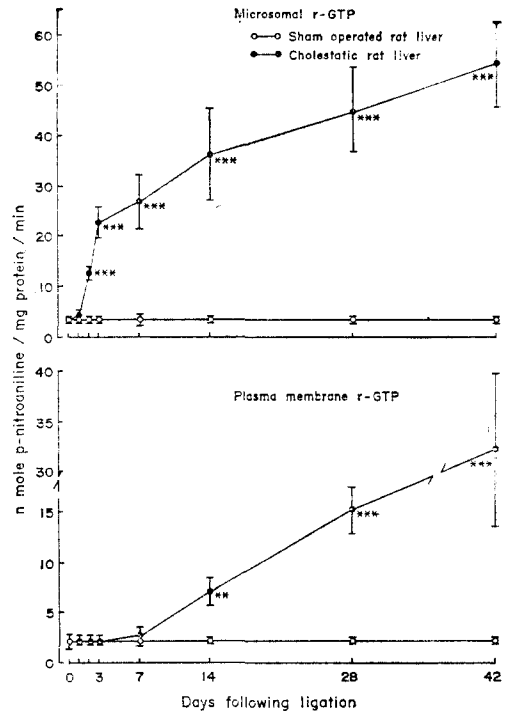


Fig. 2a. Gamma-glutamyl transpeptidase(γ -GTP) activity of liver after bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicated mean±SD with 5 rats in each group. **; P<0.01, ***; P<0.001

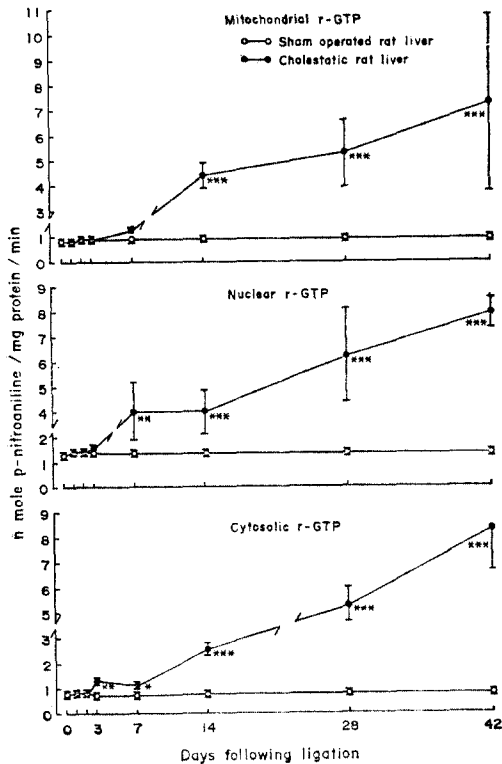


Fig. 2b. Gamma-glutamyl transpeptidase(γ -GTP) activity of liver after bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicated mean \pm SD with 5 rats in each group.
* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

더욱 증가되어 가수술군에 비해 약 893%($P < 0.001$)의 활성 증가를 보였다. 담즙울체간의 nuclei 분획의 γ -GTP 활성도는 총담관결찰 후 7일째에 가수술군에 비해 약 192%($P < 0.01$)의 증가를 보였으며 그후 계속 증가되어 42일째에는 약 468%($P < 0.001$)의 증가를 보였다. 담즙울체간의 cytosol 분획의 γ -GTP 활성도는 총담관결찰 후 3일부터 증가되었으며 이후 계속 증가되어 42일에는 가수술군에 비해 약 1022%($P < 0.001$)의 활성 증가를 보였다.

담즙울체간 세포분획 중의 ALP 활성도의 변동 :
흰쥐 담즙울체간의 microsome, plasma membrane, mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획의 ALP 활성도의 변동은 도 3a 및 3b와 같다. 담즙울체간의 microsome, mitochondria 및 cytosol 분획의 ALP 활성도는 담즙울체의 시간이 경과하면서 그 활성이 증가되었으며 plasma membrane 분획에서는 그

활성도가 반대로 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 담즙울체간의 nuclei 분획의 ALP 활성도는 총담관결찰 후 2일부터 7일까지는 그 활성이 감소되었으며 28일부터 42일까지는 그 활성이 증가되었다. 즉 담즙울체간의 microsome 분획의 ALP 활성도는 총담관 결찰 후 14일에 가수술군에 비해 약 160%($P < 0.01$)의 증가를 나타내었으며 42일에는 약 290%($P < 0.01$)의 활성 증가를 보였다. Cytosol 분획의 ALP 활성도는 총담관 결찰 후 1일부터 현저히 증가되어 2일에는 가수술군에 비해 약 220%($P < 0.001$)의 활성 증가를 보였다. Plasma membrane 분획의 ALP 활성도는 총담관결찰 후 1일부터 그 활성이 감소되나 통계학적 의의가 없었으며 이후 2일에는 가수술군에 비해 약 30%($P < 0.05$), 3일에는 약 50%($P < 0.01$), 7일에는 약 45%($P < 0.05$)의 감소를 나타내었다. 그리고 14일부터 42일까지는 그 활성이 감소되기는 하나 통계학적 의의는 없었다. 담즙울체간의 nuclei 분획의 ALP 활성도는 총담관결찰 후 2일에서 7일까지는 약 30% 내

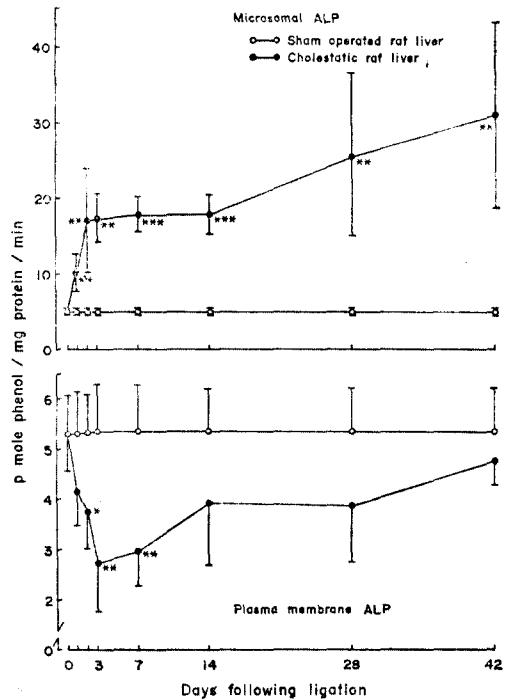


Fig. 3a. Alkaline phosphatase(ALP) activity of liver after bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicated mean \pm SD with 5 rats in each group.
* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

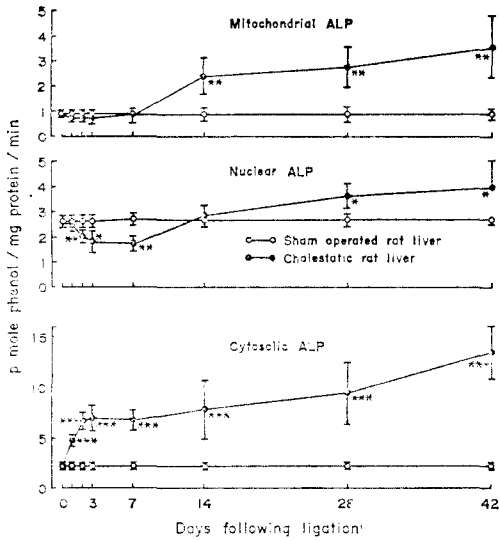


Fig. 3b. Alkaline phosphatase(ALP) activity of liver after bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicated mean±SD with 5 rats in each group. *, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001

외로 그 활성이 감소되나 28일부터는 오히려 증가되었으며 그 증가의 정도를 보면 28일에는 가수술군에 비해 약 37%(P<0.05), 42일에는 약 48%(P<0.05)의 활성 증가를 나타내었다.

고 찰

간의 배설기능에 장애가 오면 담즙색소, 담즙산, cholesterol 및 phospholipid들이 혈중에 증가 (Schiff, 1967; Shelock, 1975; 락 과 장, 1979; 락, 1980b; 락 과 장, 1985)되며 이때 5'-NT, γ -GTP, ALP, LAP 등(락, 1980a; 락 과 장, 1985) 담도세포에 풍부히 존재하는 효소와 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 및 lactate dehydrogenase(LDH) 등(Linde, 1958; 락 과 이, 1985)의 간실질세포에 함유된 효소들이 혈중에 증가한다. 이와 같이 담도세포에서 나타나는 이들 효소의 혈중 증가기전에 대해서는 혈청 ALP와 LAP는 간에서 그 생성이 증가되어 혈중에 다량 유리됨으로써 나타나는 결과(락, 1980a; 락 과 장, 1985)라고 하며 ALT, AST 및 LDH는 간세포의 투과성 항원으로 간세포외로 유출되어 나타난 것(Linde, 1958; 락 과 이, 1985)으로 알려져 있다. 그러나 5'-NT와 γ -GTP의 혈청의 증가되는 기전은 분명치 않다.

최근 락 과 장(1985)은 흰쥐의 총담관을 절찰하고 6일간 혈청과 담즙울체간에서 가용성 막결합 효소인 5'-NT, γ -GTP 및 ALP의 활성을 각각 측정 한 결과 혈청 5'-NT와 γ -GTP의 활성은 총담관절찰 후 12시간에 급격히 증가됨에 비해 담즙울체간에서는 가용성 막결합 효소인 5'-NT와 γ -GTP의 활성은 2일 후에야 증가되었다고 하며 ALP의 활성은 혈청과 담즙울체간에서 모두 총담관절찰 후 12시간부터 급격히 증가하였다고 한다.

락 과 장(1985)은 흰쥐에서 총담관절찰 직후에 Actinomycin D를 투여하고 1일 후 관찰했을 때 간조직 및 혈청의 ALP 활성은 현저히 억제된 반면에 간조직 및 혈청의 γ -GTP와 간조직의 5'-NT는 별다른 억제현상을 나타내지 않았다고 하였다. 이상의 결과를 두고 락 과 장(1985)은 다음과 같이 고찰하였다. 즉 총담관절찰 후 2일째의 담즙울체간에서의 5'-NT와 γ -GTP의 활성 증가는 담도세포의 증식이 왕성한 시기에 그 함량이 증가되는 것을 보여주는 것이라 했으며 담즙울체간의 ALP는 담즙울체간의 5'-NT나 γ -GTP보다 비교적 조기에 그 함량이 증가되는 것 같다고 했다. 그러나 ALP의 조기 함량 증가의 원인은 무엇인지 알 수 없다고 하였다. 그리고 actinomycin D를 투여했을 때의 혈청 5'-NT의 증가는 간세포막에서의 5'-NT의 수용체 감소가 그 원인인 것 같다고 했으며 담즙울체시 야기되는 혈청 5'-NT 및 γ -GTP의 혈중 증가는 간세포막의 생화학적 변형에 의하여 이들 효소의 다량 유리와 아울러 담도세포의 증식에 따른 이들 효소의 현저한 함량 증가에 의한 것이라 하였다.

이 실험 성적을 보면 담즙울체간의 5'-NT 활성도는 microsome과 cytosol분획에서 총담관절찰 후 3일째 및 그 이후 현저한 증가를 보였으며 특히 cytosol분획의 5'-NT 활성도는 담즙울체의 시간이 경과될수록 더욱 현저한 증가를 나타내었다. 그러나 plasma membrane, mitochondria 및 nuclei분획에서는 감소하는 경향을 보였다. 담즙울체간의 γ -GTP 활성도는 이 실험에서 관찰한 모든 세포분획에서 총담관절찰 후 그 시간순 달리하나 모두 활성이 증가되는 경향을 보였다. 담즙울체간에서의 ALP 활성도는 담즙울체간의 5'-NT와 마찬가지로 microsome 및 cytosol분획에서 증가되나 plasma membrane에서는 감소하는 경향을 보였다. 이상이 실험 성적으로 볼 때 락 과 장(1985)의 추론이 타당스럽지는 못하다. 따라서 이 실험 성적과 이상의 문헌상의 기전을 종합하여 보면 담즙울체시 야

기되는 혈청 5'-NT 의 활성 증가는 담즙울체간의 plasma membrane, mitochondria 및 nuclei에서 야기된 어떤 생화학적 변화가 이들 분획에 실험성된 5'-NT의 결합을 방해하는 동시에 간에서의 현저한 합성 항진과 간세포막의 투과성 항진이 그 원인이라 생각되며 담즙울체시의 혈청 ALP의 활성 증가도 이와 유사하리라 생각된다. 그러나 담즙울체시의 혈청 γ -GTP의 활성 증가는 이들과는 달리 간에서의 합성 항진과 간세포막의 투과성 항진만이 그 원인인 것 같다. 그리고 어떤 물질이 이들 효소의 합성을 증가시키는 유도인자인지는 분명치 않으나 담즙울체로 인한 담즙산들의 증가가 이들 효소의 합성을 유도하는 요인이 되지 않을까 생각되며 앞으로 이 문제는 계속 추후해 보아야 할 것이다.

요 약

담즙울체가 수반되는 간담도질환 시에 증가되는 혈청 5'-NT 및 γ -GTP의 증가 기전과 담즙울체의 시간 연장이 담즙울체간의 각종 세포분획 중의 5'-NT 및 γ -GTP 활성도에 어떤 변동을 초래시키는지를 알아 보기 위하여 흰쥐의 총담관을 결찰하고 1일부터 42일까지의 담즙울체간의 plasma membrane, microsome, mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획에서 이들 효소를 측정하는 한편 이들 세포분획에서 ALP 활성도도 함께 측정하여 그 성적을 비교 검토하였다.

흰쥐 담즙울체간의 microsome 과 cytosol 분획의 5'-NT의 활성도는 총담관결찰 후 3일부터 42일까지 현저히 증가되었으며 특히 cytosol 분획의 5'-NT의 활성도는 담즙울체의 시간이 경과될수록 더욱 현저한 증가를 보였다. 그러나 plasma membrane, mitochondria 및 nuclei 분획의 5'-NT의 활성도는 총담관결찰 후 감소되는 경향을 보였다.

흰쥐 담즙울체간의 γ -GTP 활성도는 모든 세포분획에서 담즙울체의 시간이 경과하면서 증가되는 경향을 보였다.

담즙울체간의 ALP 활성도는 담즙울체간의 5'-NT와 마찬가지로 microsome 및 cytosol 분획에서는 증가되나 plasma membrane 에서는 감소하는 경향을 보였다.

이상 성적을 보아 담즙울체가 수반되는 간담도질환시에 혈청 5'-NT의 활성도가 증가되는 것은 담즙울체간에서 이의 합성 증가와 담즙울체간의 plasma membrane, mitochondria 및 nuclei에서 이

효소의 결합력 저하와 간세포막에서의 투과성 항진이 이 효소의 세포의 유출을 촉진하여 혈중에 증가된 것이라 생각되며, 담즙울체시 γ -GTP의 활성증가는 간조직에서의 합성 항진과 간세포막의 투과성 항진만이 원인인 것 같다.

참 고 문 헌

- Albert Z, Orlowski M, Szewczuk A: Histochemical demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase. *Nature* 1961; 191: 767.
- Aronsen KF, Hanson A, Nosslin B: The value of γ -glutamyl transpeptidase in differentiating viral hepatitis from obstructive jaundice: A statistical comparison with alkaline phosphatase. *Acta Chir Scand* 1965; 130: 92.
- Aronsen KF, Nosslin B, Pihl B: The value of γ -glutamyl transpeptidase as a screen test for liver tumor. *Acta Chir Scand* 1970; 136: 17.
- Bardawill C, Chang C: Serum lactic dehydrogenase, leucine aminopeptidase and 5'-nucleotidase activities: Observation in patients with carcinoma of the pancreas and hepatobiliary disease. *Canad Med Ass J* 1963; 89: 755.
- Belfield A, Goldberg DM: Application of a continuous spectrophotometric assay for 5'-nucleotidase activity in normal subjects and patients with liver and bone disease. *Clin Chem* 1969; 15: 931.
- Belfield A: Serum alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase activities in patients with hepatobiliary disease. *Clin Chim Acta* 1972; 37: 525.
- Bergmeyer HU: *Methods of enzymatic analysis*, ed 2. New York and London, Academic Press, 1974; 2: 874.
- Brocklehurst D, Lathe GH, Aparicio SR: Serum alkaline phosphatase, nucleotide pyrophosphatase, 5'-nucleotide and lipoprotein-x in cholestasis. *Clin Chim Acta* 1976; 67: 269.
- Campbell DM: Determination of 5'-nucleotidase in blood serum. *Biochem J* 1962; 82: 34.
- Conover TE, Siebert G: On the occurrence of respiratory components in rat liver nuclei.

Biochim Biophys Acta 1965 ; 99 : 1.

Connell MD, Dinwoodie AJ: Diagnostic use of serum alkaline phosphatase isoenzymes and 5'-nucleotidase. *Clin Chim Acta* 1970 ; 30 : 235.

Dorling PR, Le Page RN: A rapid high yield method for the preparation of rat liver cell plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1973 ; 318 : 33.

Ellis G, Goldberg DM, Spooner RJ, Ward AM: Serum enzyme test in disease of the liver and biliary tree. *Am J Clin Path* 1978 ; 70 : 248.

Eshehar J, Rudzki C, Zimmerman HJ: Serum levels of 5'-nucleotidase in disease. *Am J Clin Pathol* 1967 ; 45 : 598.

Evans WH, Gurd JW: Properties of a 5'-nucleotidase purified from mouse liver plasma membranes. *Biochem J* 1973 ; 133 : 189.

Evans WH, Kremmer T, Culvenor JG: Role of membranes in bile formation: comparison of the composition of bile and liver bile canalicular plasma membrane subfraction. *Biochem J* 1976 ; 154 : 589.

Gibinski K, Szeton R, Maraszek J: Evaluation of γ -glutamyl transpeptidase (GGTP) and leucylaminopeptidase (LAP) determination in internal diseases. *Gastroenterol Basel* 1963 ; 99 : 237.

Goldberg JA, Friedman OM, Pineda EP, Smith E, Chatterji R, Stein EH, Rutenburg AM: The colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase with a synthetic substrate. *Arch Biochem Biophys* 1960 ; 91 : 61.

Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949 ; 177 : 751.

Greenberg DM, Rothstein M: Method for isolation and degradation of labelled compounds. in Colowick SP, Kaplan NO(eds): *Method in Enzymology*. Academic Press, New York, 1957, Vol 4 p 708.

Greger J, Fabianowska-Majewska K: A distinctive activity of 5'-nucleotidase for dTMP in rat liver mitochondria. *Enzyme* 1980 ; 25 : 26.

Hill PG, Sammons HG: An assessment of 5'-nucleotidase as a liver function test. *Q J Med* 1967 ; 36 : 457.

Holdsworth G, Coleman R: Enzyme profiles in mammalian bile. *Biochim Biophys Acta* 1975 ; 389 : 47.

Horiuchi S, Inoue M, Morino Y: γ -Glutamyl transpeptide: sidedness of its active site on renal brush-border membrane. *Eur J Biochem* 1977 ; 87 : 429.

Hurghey RP, Curthoys NP: Comparison of the size and physical properties of γ -glutamyl transpeptidase purified from rat kidney following solubilization with papain or with Triton X-100. *J Biol Chem* 1976 ; 251 : 7863.

Issa FS, Mulleck BM, Hinron R: 5'-Nucleotidase in liver plasma membrane and in the serum of normal and jaundiced rats. *Biochem Soc Trans* 1976 ; 4 : 55.

Kaplan MM: Alkaline phosphatase. *Gastroenterology* 1972 ; 63 : 452.

Kind PRN, King EJ: Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with aminocantipyrine. *J Clin Chem* 1954 ; 3 : 507.

Kokot F, Kyska J, Grzybek H: Gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP) in the urine and intestinal contents. *Arch Immunol Ther Exp* 1965 ; 13 : 549.

Kryszewski AJ, Neale G, Whilfield JB, Moss DW: Enzyme change in experimental biliary obstruction. *Clin Chim Acta* 1973 ; 47 : 175.

박춘식 : 총수담관을 절제한 흰쥐의 혈청 및 간장의 Leucine Amino-peptidase에 미치는 Actinomycin D의 영향. 경북의대잡지 1980a ; 21 : 126.

박춘식 : Actinomycin D의 투여가 총담관을 절제한 흰쥐의 혈청지질 분획의 농도에 미치는 영향. 경북의대잡지 1980b ; 21 : 495.

박춘식 · 장영규 : 총수담관을 절제한 흰쥐의 혈청 ceruloplasmin에 대한 actinomycin D의 효과. 한국생화학회지 1979 ; 12 : 103.

박춘식 · 장영규 : 흰쥐 담즙울체간장의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치. 계명의대논문집 1985 ; 4 : 1.

- 박춘식 · 이상일 : 흰쥐 담즙울체간의 Malate Dehydrogenase 의 활성치. 계명의대논문집 1985 ; 4 : 131.
- 박춘식 · 박정식 : 흰쥐 간세포 분리법. I. Mitochondria 및 Microsome 의 분리. 계명의대논문집 1986 ; 5 : 45.
- Linde S: A comparison between the patterns (GOT, GPT, LDH) in serum and tissue extracts in cardiac hepatic disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1958 ; 10 : 303.
- Lum G, Gambino SR: Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas, or bone. *Clin Chim* 1972 ; 18 : 358.
- Maito Y, Tsushima K: Cytosol 5'-nucleotidase from chicken liver purification and some properties. *Biochem Biophys Acta* 1976 ; 438 : 159.
- McManus JFA, Lupton CHJr, Harden G: Histochemical studies of 5'-nucleotidase. I. Method and specificity. *Lab Invest* 1952 ; 1 : 480.
- Mullock BM, Issa FS, Hinton RH: Bile 5'-nucleotidase in the serum of jaundiced rats. *Clin Chim Acta* 1977 ; 79 : 129.
- Naftalin L, Child VJ, Morley DA, Smith DA: Observations on the site of origin of serum γ -glutamyl transpeptidase activity. *Clin Chim Acta* 1969 ; 26 : 297.
- Naidoo D: The activity of 5'-nucleotidase determined histochemically in the developing rat brain. *J Histochem Cytochem* 1962 ; 10 : 421.
- Newman W, Feigin I, Wolf A, Kabat EA: Histochemical studies on tissue enzyme. *Am J Pathol* 1950 ; 26 : 257.
- Novikoff AB, Essner E: The histochemical demonstration of a specific phosphatase (5'-nucleotidase). *Biochem J* 1952 ; 50 : 534.
- Orlowski M, Meister A: γ -glutamyl β -nitroanilide: A new convenient substrate for determination and study of L and D- γ -glutamyl transpeptidase activities. *Biochem Biophys Acta* 1963 ; 73 : 679.
- Orlowski M, Szewczuk A: Colorimetric determination of gamma-glutamyl transpeptidase activity in human serum and tissue with synthetic substrates. *Acta Biochem Polon* 1961 ; 8 : 189.
- Reghetti ABB, Kaplan MM: Disparate responses of serum and hepatic alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase to bile duct obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1972 ; 62 : 1034.
- Reis JJ: The specificity of phosphomonoesterases in human tissues. *Biochem J* 1951 ; 48 : 548.
- Riemer BL, Widnell CC: The demonstration of a specific 5'-nucleotidase activity in rat tissue. *Arch Biochem Biophys* 1975 ; 171 : 343.
- Rosaki SB, Rau D: Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in alcoholism. *Clin Chim Acta* 1972 ; 39 : 41.
- Rutenburg AM, Goldberg JA, Pineda EP: Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in hepatobiliary pancreatic disease. *Gastroenterology* 1963 ; 45 : 43.
- Rutenburg AM, Kim H, Fischbein JW, Hancker JS, Wasserkrug HL, Seligman AM: Histochemical and ultrastructural demonstration of γ -glutamyl transpeptidase activity. *J Histochem Cytochem* 1969 ; 17 : 517.
- Scheffler WC: *Statistics for the biological Sciences*, ed 2. USA Menlo Park, Addison-Wesley Publishing Company, 1980, p 84.
- Schiff L: *Diseases of the liver*, ed 2. Philadelphia Montreal, Lippincott Company, 1967, p 197.
- Shelock S: *Diseases of the liver and biliary system*, ed 5. Oxford London Edinburgh, Melbourne Blackwell Scientific, 1975, p 234.
- Song CS, Bodansky G: Subcellular localization and properties of 5'-nucleotidase in the rat liver. *J Biol Chem* 1967 ; 242 : 694.
- Song CS, Rubin W, Rifkind AB, Kappas A: Plasma membranes of the rat liver, isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculi. *J Cell Biol* 1969 ; 41 : 124.
- 鈴木宏 : 肝과 alkaline phosphatase(日文). 代謝誌 1976 ; 13 : 293.

- Szezeklik E, Orłowski M, Szewczuk A: Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Gastroenterology* 1961; 41: 353.
- Szewczuk A: A soluble form γ -glutamyl transpeptidase activity in human tissue. *Clin Chim Acta* 1972; 39: 41.
- Villa L, Bioguardi N, Agostoni A, Ideo G, Stabilini R: Prognostic value of serum γ -glutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Enzyme Biol Clin* 1966; 7: 193.
- Vojvoda OS, Coleman R, Holdworth G: Effects of different bile salt upon the composition and morphology of liver plasma membrane preparation. *Biochem Biophys Acta* 1977; 465: 68.
- Whitfield JB, Pounder RE, Neale G, Moss DW: Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Gut* 1972; 13: 702.
- Widnell CC: Cytochemical localization of 5'-nucleotidase in subcellular fractions isolated from rat liver. I. The origin of 5'-nucleotidase activity in microsomes. *J Cell Biol* 1972; 52: 542.
- Wilkinson JH: *The principles and practice of diagnostic enzymology*, London, Edward Arnold, 1976a, p 144.
- Wilkinson JH: *The principles and practice of diagnostic enzymology*, London, Edward Arnold, 1976b, p 303.
- Young LI: Serum 5'-nucleotidase: Characterization and valuation in disease states. *Ann N Y Acad Sci* 1958; 75: 357.